

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-261000

(43)公開日 平成5年(1993)10月12日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	8114-4B		
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/04		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数26(全 19 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-1566

(22)出願日 平成5年(1993)1月8日

(31)優先権主張番号 8 1 9 3 5 9

(32)優先日 1992年1月9日

(33)優先権主張国 米国 (U S)

(71)出願人 592085104

エフ. ホフマンロー ロシュ アクチュン
ゲゼルシャフト

F. HOFFMANN-LA ROCHE
AKTIENGESELLSCHAFT

スイス国, ツェーハー4002 バーゼル,
グレンツァハーシュトラッセ 124

(72)発明者 ジュディス パーパラ ウェイス
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94618,
オークランド, オーバーン アベニュー
6012

(74)代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

(54)【発明の名称】 ギアルジア・ランブリアの存在を決定するための方法及び試薬

(57)【要約】

【目的】 ギアルジア・ランブリア寄生虫の存在を決定するための高感度の方法及びそのための試験を提供する。

【構成】 ギアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*) DNAの標的核酸配列を用いてギアルジア・ランブリアを含むと疑われるサンプル中のギアルジア・ランブリアの存否を決定する方法であって、

(a) 18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251～1433の領域内の配列を含有する標的配列を検出可能なレベルに増幅し;そして

(b) 該増幅された生成物を検出する、ことを含んで成る方法;並びにそのためのプライマー及びプローブ。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ギアルジア・ランブリア (*Giardia lamblia*) DNAの標的核酸配列を用いてギアルジア・ランブリアを含むと疑われるサンプル中のギアルジア・ランブリアの存否を決定する方法であって、

(a) 18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433の領域内の配列を含有する標的配列を検出可能なレベルに増幅し；そして

(b) 該増幅された生成物を検出する、ことを含んで成る方法。

【請求項2】 ギアルジア・ランブリアDNAの標的核酸配列を使用してギアルジア・ランブリアを含むと疑われるサンプル中のギアルジア・ランブリアの存否を決定する方法であって、

(a) 18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433の領域内の配列を含有する標的配列を検出可能なレベルに増幅し；

(b) 前記標的配列内のオリゴヌクレオチド配列に実質的に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドプローブを用意し；

(c) 前記オリゴヌクレオチドプローブと前記増幅された標的配列との間でハイブリダイゼーションを生じさせる条件下で該標的配列と該プローブとをインキュベートし；そして

(d) 前記増幅された標的配列と前記オリゴヌクレオチドプローブとの間に形成されたハイブリドが存在すればそれを検出する；ことを含んで成る方法。

【請求項3】 前記段階(a)をPCR技術を用いて行う、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 PCRにおいて使用されるプライマーの一方が10～30ヌクレオチドを含有しそして配列番号：4の配列の少なくとも部分を含んで成り、そしてPCRにおいて使用されるプライマーの他方が10～30ヌクレオチドを含有しそして配列番号：5の配列の少なくとも部分を含んで成る、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 前記プライマーの一方が配列番号：4の配列を含有し、そして前記プライマーの他方が配列番号：5の配列を含有する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記プローブが、18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433の相補体の少なくとも部分を含んで成る14～30ヌクレオチドを含有する、請求項2に記載の方法。

【請求項7】 前記プローブが配列番号：6、配列番号：7、又は配列番号：8の配列を含有する、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433の領域内の標的配列を含有するギアルジア・ランブリアDNAの2本の相補鎖の一方とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項9】 10～30ヌクレオチドを含み、そして配列番号：4又は配列番号：5の配列の少なくとも部分を含んで成る請求項8に記載のプライマー。

【請求項10】 配列番号：4又は配列番号：5の配列を含有する請求項9に記載のプライマー。

【請求項11】 18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433の領域内の標的配列を含有するギアルジア・ランブリアDNAの2本の相補鎖の一方とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項12】 前記プローブが少なくとも14ヌクレオチドを含有し、そして前記標的配列に少なくとも75%相補的である、請求項11に記載のプローブ。

【請求項13】 前記プローブが、配列番号：6のオリゴヌクレオチド又はその相補体の少なくとも部分を含む、請求項12に記載のプローブ。

【請求項14】 前記プローブが、配列番号：7のオリゴヌクレオチド又はその相補体の少なくとも部分を含む、請求項12に記載のプローブ。

【請求項15】 前記プローブが、配列番号：8のオリゴヌクレオチド又はその相補体の少なくとも部分を含む、請求項12に記載のプローブ。

【請求項16】 1対のオリゴヌクレオチドプライマーを含む水性溶液から成る組成物であって、該プライマーにギアルジア・ランブリアDNAの標的核酸配列の異なる相補鎖にハイブリダイズすることができ、該標的配列は18S rRNA遺伝子の核酸1251-1433の領域内の配列を含有し、これにより該プライマーは前記鎖とのハイブリダイゼーション及びそれに続く延長により該標的配列を増幅するための鋳型として機能する、ことを特徴とする前記組成物。

【請求項17】 前記溶液が補助溶剤として不活性有機極性溶剤を含む、請求項16に記載の組成物。

【請求項18】 前記溶液が約容量1%～約20容量%の前記補助溶剤を含有する、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】 前記補助溶剤がグリセロール、ジメチルスルホキシド又はホルムアミドである、請求項17又は18に記載の組成物。

【請求項20】 前記プライマーの一方が10～30ヌクレオチドを含みそして配列番号：4の配列の少なくとも部分を含んで成り、そして前記プライマーの他方が10～30ヌクレオチドを含みそして配列番号：5の配列の少なくとも部分を含んで成る、請求項16～19のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項21】 前記プライマーの一方が配列番号：4の配列を含有し、そして前記プライマーの他方が配列番号：5の配列を含有する、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】 前記段階(a)において請求項16～21のいずれか1項に記載の組成物を使用する、請求項

3に記載の方法。

【請求項23】 請求項8～10のいずれか1項に記載の少なくとも1つのプライマーを含んで成るキット。

【請求項24】 請求項11～15のいずれか1項に記載のプロープをさらに含んで成る、請求項23に記載のキット。

【請求項25】 請求項16～21のいずれか1項に記載の組成物を含んで成るキット。

【請求項26】 サンプル中のギアルジア・ランブリアの存在を決定するための標的核酸配列であって、該配列が配列番号：1、配列番号：2及び配列番号：3から成る群から選択された配列又はその相補体に本質的に又は正確に対応することの特徴とする標的核酸配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は一般にランブル鞭毛虫症（*girdiasis*）を生じさせることができる寄生虫の検出のための方法及び試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】原生動物性寄生虫ギアルジア・ランブリア（*Giardia lamblia*）〔ギアルジア・ドゥオデナリス（*G. duodenalis*）はヒト及び多くの他の哺乳類の小腸に生息する。事実、ギアルジアの種は少なくとも40種の脊椎動物に寄生している。この寄生虫は先進国及び未開発国の両者においてヒトの下痢の主たる原因である。米国においては、保育所に来る幼児及び子ども、旅行者、バックパッカー並びにキャンパー、並びに免疫不全の患者の間で感染が起こる。

【0003】さらに、汚染された水の供給から流行が起こり得る。1986～1988年にはG. ランブリアは米国における水媒介疾患の激増の主たる確認可能な原因であった。現在、鈍感なそして非特異的な診断手段によってこの疾患を管理することは困難である。ランブル鞭毛虫症の診断は主として糞便試料中に存在するギアルジアのシスト（*cyst*）の顕微鏡検出に頼っている。表面抗原と反応する抗体が、時として、糞便試料の直接蛍光抗体染色のため及び溶液性イムノアッセイにおいて使用される。しかしながら、シスト（*cyst*）の排出は気まぐれであることが知られており、従って分析のために多数の試料が必要である。

【0004】十二指腸吸引物及び生検体は多数の陽性結果をもたらさず、そして患者にとってより敏感な方法である。血清抗ギアルジアIgG及びIgMタイターの測定による血清診断は現在の感染と過去の感染とを区別できない。診断像をさらに複雑にしているのは、見かけ上無症状の感染が比較的効率が存在することである。さらに、種々の哺乳類宿主の種のために、研究者はギアルジア間の種族分類（*speciation*）の基準に疑問をもっており、そしてヒトに感染するG. ランブリアの株間の相違及び表面抗原の多様性の証拠が存在する。

【0005】種族分類（すなわち、ギアルジア属内のサブグループの存在）は長年にわたる多くの研究及び議論の対象であった。伝統的に、分類学的基準は細胞形態、細胞寸法、及び宿主の特異性を含んでいる。志願者研究、動物伝染実験及び細胞形態学の使用が多くの異なる哺乳動物種に存在しそして生存しているにも拘らずヒトに感染しそして次に疾患を発生することができるギアルジアのグループ又は種が単一であるという概念を支持している。

10 【0006】分子技術、例えば電気泳動的核形分類、アイソエンザイム分析、制限酵素分析、表面抗原のラベル化及びモノクローナル抗体によるエピトープマッピングの最近の使用がしばしば、一般的に類似するG. ランブリアグループ内の多形性を同定している。これらの疑問の解明は、栄養型（*trophozoite*）及び存在するシスト（*cyst*）の純粋な集団を得ることで培養することの困難性により妨げられてきた。特定のDNA配列を試験するためにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が特に適用可能である。

20 【0007】糞便及び他の検体、例えば環境サンプル（例えば水、排水）、及び臨床検体（例えば、十二指腸アスピレート、生検体、獣医検体等）中のG. ランブリアを検出することができる簡単な、迅速な、敏感な且つ特異的な診断技法の明らかな必要性が存在する。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）の使用は好範囲の種類の細菌、真菌、ウイルス及び寄生性病原体の検出に革命をもたらした。病原体の濃縮及び生体外培養は必要ではなく、そして比較的粗製の臨床検体が検出及び診断のための検酸源を提供することができる。

30 【0008】PCRは、特定の核酸配列の標的化された増幅を行い、これは検出のためのコピー数を劇的に増加させ、そして同時に核酸の分析の複雑さを少なくする。病原体の検出及び診断のため、発病力因子をコードする遺伝子又は普遍（*universal*）遺伝子のいずれかを増幅の標的にすることができる。小サブユニットリボソームRNA（*rRNA*）が生存のために必要であり、そしてこれは保有遺伝子領域及び可変遺伝子領域の両方が必要である。*rRNA*遺伝子内のプライマー配列及びプロープ配列の選択が属特異的、種特異的又は「普遍的」（*universal*）増幅及び検出系の設計を可能にする。

40 【0009】ギアルジア・ランブリア18SリボソームRNA遺伝子の公表されたヌクレオチド配列がSogin, M. L. ら、*Science* 243、75-777（1989）（Sogin文献）、及びHealey, A. J., *Nucleic Acids Res.* 18、4006（1990）、並びに原核性及び真核性小サブユニットリボソームRNA遺伝子の公表された整列[Neeffsら、*Nucleic Acids Res.* 18、2237-2317（1990）]に示されてい

る。

【0010】G. ランブリアの核酸を検出するための過去の試みは、放射能ラベルされたDNAプローブ：属特異的クローン化DNA断片〔Butcher, P. D. 及びM. J. G. Farthing, Biochem. Soc. Trans. 17, 365-364 (1989)〕、全ゲノムDNAのプローブ混合物〔Lewis, D. J. M. ら、Lancet 336, 257 (1990)〕、及び最も最近では18S rRNA遺伝子の2656p断片に対応するcDNAプローブ〔Abbaszadegan, M. ら、Appl. Env. Microbiol. 57, 927-931 (1991)〕を使用している。糞便検体からの核酸抽出物中のG. ランブリアDNAの検出は全ゲノムプローブを用いて不成功であった。

【0011】cDNAを用いる検出系が水サンプルのモニターへの適用のために開発された。この測定は、水サンプル濃縮物ml当り1～5個のシストを検出することができた。cDNAプローブ試験は属特異的であるが、しかしギアルジアの小鳥からの単離体に対して低い感度を有しており、そして栄養型(trophozoite)のヒト単離体に対して適用された場合、異なるレベルの感度を有していた。

【0012】

【発明の概要】本発明はランブル鞭毛虫症を惹起する病原体の迅速な検出及び同定のための方法及び試薬を提供する。本発明において、糞便検体中のG. ランブリアDNAの存在を検出するためのPCRを用いる測定法が開発され、そして標的としてG. ランブリア18S rRNA遺伝子配列を用いて試験された。PCRのための条件の最適化に続き、測定の感度及び特異性が確立された。種々の地理的位置及び哺乳類宿主から得られた広範囲の種類の単離体が分析された。最後に、寄生虫感染を有する個体からの糞便検体中のG. ランブリアの検出の信頼性が評価された。

【0013】本発明は、糞便検体及び胃生検体中のギアルジアの栄養型(trophozoite)及びシスト(cyst)の直接検出を可能にし、検体の顕微鏡観察を必要とせず、診断の非侵略的方法を提供する。現在の血清学的試験は感染に対する抗体応答を測定するものであり、そしてそれ故に療法又は病気の再発をモニターするための適当な表示ではない。本発明はまた、水及び排泄液のごとき環境サンプル中のG. ランブリアの検出を可能にする。

【0014】好ましい態様において、ゲノムDNA又は18S rRNAから転写された相補的DNAからの標的領域を定義された条件下で且つ定義されたプライマーを用いてPCRにより増幅する。生ずる増幅されたDNAを定義されたプローブにより処理する。本発明はさらに、ランブル鞭毛虫症を惹起する病原体を同定するため

の特異的プローブ及びそれらの相補体に関する。本発明はまた特異的プローブがそれに由来するユニークなオリゴヌクレオチド配列、変異体、断片、及びそのサブ配列に関する。

【0015】さらに、PCRにおいて使用されるプライマーのユニーク配列及びその条件も記載される。さらに、ギアルジア・ランブリアの幾つかの単離体についての、18S rRNAの領域における核酸配列データも記載される。ギアルジアのこの種の異なる単離体が核酸1251-1433の領域内に異なる配列を含むことは今まで示されていない。この配列情報は実験的に得られたものである。第I表は、種々の単離体からのDNAを用いて得られたG. ランブリアからの、プライマーJW1 (配列番号：4) 及びJW2 (配列番号：5) により増幅された標的領域18S rRNA遺伝子セグメントからの核酸配列データを示す。

【0016】本発明は、病原体又はその種に特徴的な増幅されたヌクレオチド配列にプローブをハイブリダイズさせることにより、ランブル鞭毛虫症を惹起することができる病原体の存在を決定し、それを同定する方法に関する。本明細書において、下記の用語は下記の通りに定義される。

ヌクレオチド：リン酸基、5' 炭素糖及び窒素含有塩基から成る核酸のサブユニットである。RNAにおいては5' 炭素糖はリボースである。DNAにおいてはそれは2-デオキシリボースである。この用語はまた、この様なサブユニットの類似体をも含む。

【0017】ヌクレオチドポリマー：ホスボジエステル結合により連結された少なくとも2個のヌクレオチド。オリゴヌクレオチド：長さが一般に約10～約100ヌクレオチドであるが100ヌクレオチドより多くてもよいヌクレオチドポリマー。

核酸プローブ：相補的単鎖標的核酸配列と結合して2本鎖分子(ハイブリッド)を形成する単鎖核酸配列。核酸プローブはオリゴヌクレオチド又はヌクレオチドポリマーであることができる。

【0018】ハイブリッド：相補的塩基間のWatson-Crick塩基対合又は非標準的塩基対合により2本の単鎖核酸配列間で形成される複合体。

ハイブリダイゼーション：核酸の2本の相補鎖が一緒になって2本鎖分子(ハイブリッド)を形成する過程。

相補性：対応する鎖に対するWatson-Krick塩基相間の水素結合によりハイブリッド又は2本鎖DNA：DNA、RNA：RNA、又はDNA：RNAを形成することができるDNA又はRNAの単鎖の塩基配列により与えられる性質。アデニン(A)は通常チミン(T)又はウラシル(U)と相補的であり、他方グアニン(G)は通常シトシン(C)と相補的である。

【0019】本発明によれば、本発明者らは、G. ランブリアの種々の異なる株のDNA配列であって、文献中

10

20

30

40

50

に公表されているもの及び本発明者ら自身がPCR法を用いて決定したもの、の比較分析により、ギアルジア・ランブリアの標的配列を決定した。本発明者らの分析の結果として、本発明者らは第I表に示す標的配列を決定した。これらの配列は1251-1433のオリゴヌクレオチドを示すが、グループ1（配列番号：1）の1277のヌクレオチドがGにより置き換えられてグループ2（配列番号：2）となってもよく、またグループ1の1298のヌクレオチドがTにより置き換えられてグループ3（配列番号：3）になってもよい。

【0020】本発明によれば、本発明者らは、第I表に示す標的配列の部分とハイブリダイズすることができるように第I表に示す標的配列又はその相補体の部分と十分に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーを設計した。本発明によれば、プライマーは第I表に示す標的配列又はそれらの相補配列のために設計される。こうして、これらのプライマーはギアルジア・ランブリアDN *

* Aの別々の鎖の一方にハイブリダイズするように別々の鎖に対して十分に相補的である。これらのプライマーのそれぞれは別々のDNA鎖にハイブリダイズする能力を有する。

【0021】こうして、ギアルジア・ランブリアの種々の株のDNAの標的核酸配列の同定を通して、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に従ってこれらのプライマーを用いて、ギアルジア・ランブリアを含有することが疑われる流体サンプル中のギアルジア・ランブリアDNAの標的核酸配列を増幅することができる。本発明によれば、本発明者らは、少なくとも10個のヌクレオチドを含有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いてこの反応を実施することができる。一般に、これらのヌクレオチドプライマーは、約14～30ヌクレオチドを含有することができる。

【0022】

【表1】

第1表

G.ランブリアグループ1	1251	1310	GCGCACCAGGAATGCTCTTGTAGCGCGCCGCCCCACCGCGCGCGGACGGCTCCCTGCCC
G.ランブリアグループ2	1311	1370	CTTCTACACCGCGCGTCTCTCTACCGACTGGCGCGCGGAGCGCGCGGACGCG
G.ランブリアグループ3	1371	1430	CGAAGCGCGCGGAGCGCGCGCGCGCTGGAGGAGGAGAGTCCGTACAAGGTATCCGTAGG
G.ランブリアグループ1	1	1	TGA (1431 ~ 1433)
G.ランブリアグループ2	2	2	...
G.ランブリアグループ3	3	3	...

・グループ1の配列と同じヌクレオチド位置は点で示す。

・下線はプロンプのア18S rRNA遺伝子の番号付与法による。

・番号はG.ランブリアの公表された配列 (Sogin ら、1989; Healey ら、1990) WB 株について実験的

グループ1 : 配列番号: 1; G.ランブリアの公表された配列

グループ2 : 配列番号: 2; Be-1、E-9/M、GIM、PM、CM、GS/M-H7株から実験的に決定された配列。この配列を有す

る単離体は、ストリンジエント洗浄条件下でプロンプRDR34に対してわずかに低下した結合性を示す。

(例7)

グループ3 : 配列番号: 3; E-2/M、JH、AB株から実験的に決定された配列。この配列を有する単離体はストリンジエ

ント洗浄条件下でRDR34に対して非常に低下した結合を示す。プロンプRDR313はこの配列に強くハイブ

リダイズする。

【0023】本発明によれば、任意のプライマーはその様なオリゴヌクレオチドから形成され、ギアルジア・ランブリアのDNAの別々の鎖にハイブリダイズする程十分に相補的であり、そして前記ポリメラーゼ連鎖反応により増幅された場合、標的DNA配列を含有する発現生成物を形成する。標的DNA配列は、該標的領域のポリヌクレオチド配列に実質的に相補的な少なくとも14個のヌクレオチドを含有する適当なオリゴヌクレオチド

* 50

・ロープへのハイブリダイゼーションにより検出され得る。一般に、これらのオリゴヌクレオチドプローブは約14〜約30ヌクレオチドを含有する。

【0024】本発明によれば、第1表のグループ1、2及び3に示す配列1251-1433 (それぞれ、配列番号: 1、配列番号: 2及び配列番号: 3) を含有するオリゴヌクレオチドが調製された。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、本発明のプライマー及びプローブが

設計された。本発明によれば、サンプル中のギアルジア・ランブリアの存在についての試験は、ギアルジア・ランブリアの別々の鎖にハイブリダイズするために十分にそれに相補的であるオリゴヌクレオチドプライマーを含有する水溶液によりサンプルを処理することにより行われる。本発明によれば、サンプルを処理するために使用される溶液は補助溶剤として不活性有機極性溶剤を含有することができる。

【0025】水溶液の成分として任意の常用の不活性有機極性溶剤を使用することができる。本発明の好ましい態様によれば、補助溶剤として使用される極性溶剤はグリセロール、ジメチルスルホキシドもしくはホルムアミド、又はそれらの混合物であることができる。さらに、本発明の好ましい態様によれば、補助溶剤は、試薬されるべきサンプルを処理するために使用される溶液の約1〜約20容量%を占めるべきである。

【0026】感染剤の認識のためのプローブとしての特異的ポリヌクレオチド配列の使用は、問題の多い免疫学的同定測定に代る価値ある方法となりつつある。例えば、WO84/02721は、標的核酸配列を検出するためにハイブリダイゼーション方法においてリボゾームRNA、トランスファーRNA又は他のRNAから構成される標的核酸配列に相補的な核酸プローブの使用を記載している。

【0027】この測定方法は既知のDNAハイブリダイゼーション測定よりも高い感度及び特異性を提供するであろうが、相補的プローブの使用を必要とするハイブリダイゼーション法は一般に被検生物の培養及び／又は濃縮に大きく依存し、そしてそれ故に迅速な診断のために適当でない。DNA又はRNA標的を増幅する手段が利用可能であれば、プローブを臨床検体に対して直接使用することができる。

【0028】本発明において使用されるプライマーのユニーク配列が、好ましい又は必須のPCR条件と共に本明細書において記載される。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、試験管内培養が困難であるか又は長期に及ぶ小数の病原体の検出のために、又は検出のために生きた検体の存在を必要とする他の方法のための代替法として、使用し得る強力な技法である。最も単純な形態において、PCRは、標的DNA中の注目の領域の対立端にハイブリダイズし且つ該領域を挟む2個のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて特定のDNA配列を酵素的に合成するための試験管内法である。

【0029】鋳形の変性、プライマーアニーリング及びアニールされたプライマーのDNAポリメラーゼによる延長を含むサイクルの一連の反復が、前記プライマーの5'-末端により定義される末端を有する特定の断片の指数的増加をもたらす。PCRは 10^{12} の係数をもって特定のDNA配列の選択的濃縮を行うことができると言われている。

【0030】PCR法はSaikiら、Science 230:1350(1985)に記載されており、そして米国特許No. 4,683,195、No. 4,683,202、No. 4,800,159、及びNo. 4,965,188の対象である。この方法は、鎌形赤血球貧血に関連するβ-グロビン遺伝子(Saikiら、前掲)及びヒト免疫不全ウイルス(HIV)RNA(Byrneら、Nucl. Acids. Res. 16:4165(1988))における異常(aberrant)配列の存在を検出するために使用されている。

【0031】本発明は、選択された標的領域を含有するポリヌクレオチドを含むことが疑われるサンプル中の原生動物ポリヌクレオチドの存在を決定するための方法を提供し、この方法は、

(a) 標的領域を、それが存在するとすれば、検出可能なレベルに増幅し；

(b) 前記標的領域中の、疑われる病原体の種に特異的なポリヌクレオチド配列に対して実質的に相補的である配列を含有するポリヌクレオチドプローブを用意し；

(c) 増幅された標的領域を、それが存在するとすれば、ハイブリッドデュプレックスの特異性を許容する条件下でヌクレオチドプローブと共にインキュベートし；そして

(d) 存在するとすれば前記増幅された標的領域とポリヌクレオチドプローブとの間で形成されたハイブリッドを検出する；ことを含んで成る。

【0032】こうして、本発明の方法は、従来技術の検出方法によって今まで可能であったのよりも迅速に、疑われる病原体の存在を決定することを可能にする。基本的なPCR法は次の様にして行われる。注目の特定の核酸配列、すなわち「標的配列」を含むことが疑われるサンプルが提供される。サンプル中に含まれる核酸は必要であればまずcDNAに逆転写され、そして次に当業界において知られている任意の適当な変性法、例えば物理的、化学的又は酵素的な方法、を用いて変性される。鎖分離のための好ましい物理的方法は、核酸が完全に(>99%)変性されるまでそれを加熱することを含む。典型的な加熱変性は、現在の技法を用いて、約80℃〜約100℃の温度及び約5秒間〜10分間の時間を用いる。

【0033】次に、単鎖オリゴヌクレオチド鎖にプライマーを結合させることができるハイブリダイゼーション条件下で、変性されたDNA鎖を選択されたオリゴヌクレオチドプライマーと共にインキュベートする。当業界において知られているように、プライマーは、1つのプライマーから合成された伸長生成物とその相補体から分離された時に他のプライマーの延長のための鋳型として機能し、定義された長さの複製鎖をもたらすように選択される。

【0034】プライマーは、重合のための試薬の存在下で伸長生成物の合成を開始するために十分な長さでなけ

ればならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー源及び使用方法を含む多くの因子に依存するであろう。例えば、標的配列の複雑さに依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは典型的には約15～30ヌクレオチドを含有するが、より多くの又はより小数のヌクレオチドを含有することもできる。より短いプライマー分子は一般に、鋳型との十分に安定なハイブリド複合体を形成するためにより低い温度を必要とする。プライマーは、それらの対応する鎖と選択的にハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。

【0035】本発明において使用されるプライマーは、増幅されるべき各特定の配列の異なる鎖に「実質的に」相当するように選択される。プライマーは鋳型の正確な配列を反映する必要はないが、それらの対応する鎖と選択的にハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。プライマーが、増幅されるべき鎖の一方の配列とハイブリダイズしそしてそれにより重合手段により伸長され得るデュプレックス構造を形成するために十分該配列に対して相補的である限り、該プライマー中に非相補的塩基又はより長い配列が散在していてもよい。プライマーの非相補的核酸配列は制限酵素部位を含むことができる。標的配列の末端への制限酵素部位の付加は、標的配列の引き続くクローニングのために特に有用である。

【0036】オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブは任意の適当な方法により製造することができる。特定の配列のオリゴヌクレオチドの製造方法は当業界において知られており、そして例えば、適当な配列のクローニング及び制限消化、並びに直接化合物合成を包含する。プライマーは所望により、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的又は化学的手段により検出可能な手段を導入することにより標識することができる。

【0037】次に、オリゴヌクレオチドプライマーの鋳型依存的伸長が、適当な量の4種類のデオキシリボヌクレオチドトリホスフェート(dATP, dGTP, dCTP及びdTTP)又は類似体の存在下で、適当な塩、金属陽イオン及びpH緩衝系を含む反応媒体中で、重合試薬により触媒される。適当な重合試薬は、プライマー及び鋳型依存的DNA合成を触媒することが知られている酵素である。

【0038】既知のDNAポリメラーゼには、例えば、大腸菌(*E. coli*) DNAポリメラーゼI又はそのKlenow断片、T4 DNAポリメラーゼが、Taq DNAポリメラーゼが、テルムス・サーモフィルス(*Thermus thermophilus*)からのTth DNAポリメラーゼ、及びサーモコッカス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)からのDNAポリメラーゼが含まれる。これらのDNAポリメラーゼを用いてDNA合成を触媒するための反応条件は当業界においてよく知られている。

【0039】合成の生成物は鋳型鎖とプライマー伸長鎖とから成るデュプレックス分子であり、標的配列を含有する。これらの生成物は今度は他のラウンドの複製のための鋳型として機能する。複製の第2ラウンドにおいて、第1サイクルからのプライマー伸長鎖がその相補的プライマーにアニールされ、5'-末端及び3'-末端においてプライマー配列又はその相補体により境界が定められている「短い」生成物が合成によりもたらされる。

10 【0040】変性、プライマーアニーリング、及び延長の反復するサイクルが、プライマーにより規定された標的領域の指数的蓄積をもたらす。核酸の標的領域を含むポリヌクレオチドの所望量を達成するために十分なサイクルが行われる。該所望量は多様であり、そして生成物ポリヌクレオチドが発揮すべき機能により決定される。

20 【0041】PCR法は多数の暫時的配列中で行うことができる。例えば、これは段階的に行うことができ、この場合、各段階の後に新たな試薬が添加され、あるいはすべての試薬が同時に添加される態様で行われ、あるいは部分的に段階的態様で行われ、この場合は新たな試薬が所定数の段階の後に加えられる。

30 【0042】好ましい態様においては、PCR反応は熱安定性酵素を用いる自動化された方法として行われる。この方法においては、反応混合物が変性段階、プライマーアニール段階及び合成段階を通して循環される。熱安定性酵素と共に使用するために特に適合されたDNA熱サイクラーを用いることができ、これは液体取扱い系を用いることなく温度循環を用い、これにより各サイクルにおいて酵素を添加する必要性が除去される。この型の機器は市販されている。

【0043】PCRによる増幅の後、標的DNAが十分に増幅されており、そしてプライマーが増幅されるべき標的領域に対して高度に特異的であれば、標的ポリヌクレオチドをゲル分析により直接検出することができる。PCR効率を確保するため、グリセロール及び他の溶剤、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)及びホルムアミドを用いて、増幅レベルにおけるPCRの感度を増加し、そして強い二次構造を有するDNAの領域に関する問題を克服することができる。これらの問題は、

40 (1) 重合試薬により十分に伸長されない鋳型が高頻度でないことによるPCRの低い効率、又は(2) 高いGC含量による、高温でのデュプレックスDNAの不完全な変性を包含する。

50 【0044】この様な溶剤の使用は増幅のレベルにおける測定感度をDNAのおよそ数ピコグラムまで上昇させることができる。このレベルの感度は、増幅された標的DNAをプローブを用いて検出する必要性を除去し、そしてそれによりプローブの標識化、ゲル電気泳動、サザンブロッティング、フィルターハイブリダイゼーション、洗浄及びオートラジオグラフィーの必要性を免す

る。グリセロールの濃度範囲は約5%~20%(V/V)であり、そしてDMSOの濃度範囲は約3%~10%(V/V)である。

【0045】あるいは、より高い感度を達成するため、ストリンジエント~低ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で標的配列のポリヌクレオチドと安定なハイブリドを形成するポリヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションにより、標的ポリヌクレオチドを検出することができる。プローブが標的配列に対して完全に相補的であり(すなわち、約99%以上)ことが予想される場合、ストリンジエントな条件が使用されるであろう。幾らかのミスマッチが予想される場合、例えばプローブが完全には相補的でないという結果を伴って、変異した株が予想される場合、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは低くされるであろう。

【0046】しかしながら、非特異的/偶発的結合を排除する条件が選択される。ハイブリダイゼーションに影響を与え、そして非特異的結合に対して選択する条件は当業界において知られている。一般に、より低い塩濃度及びより高い温度が結合のストリンジエンシーを上昇させる。例えば、ストリンジエント条件は約0.1×SSC、0.1%SDSを含有する溶液中での約65℃のインキュベーション/洗浄温度でのインキュベーションであり、そして中程度のインキュベーション条件は約1~2M×SSC、0.1%SDSを含有する溶液中での約50℃~65℃インキュベーション/洗浄温度でのインキュベーションであると、通常考えられている。低ストリンジエンシー条件は2×SSC及び約30℃~50℃である。

【0047】ハイブリダイゼーション及び洗浄の他の方法は、低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション(5×SSPE、0.5%SDS)及びそれに続く、3Mテトラメチルアンモニウムクロリド(TMACl)の存在下での高ストリンジエンシー洗浄を行うことである。TMAClの効果はA-T及びG-C塩基対の相対結合性を等しくして、所与の温度でのハイブリダイゼーションの効率がポリヌクレオチドの長さの関数であるようにすることである。

【0048】TMAClを用いて、洗浄の温度を変えることにより所望のストリンジエンシーのレベルを達成することが可能である(テトラメチルアンモニウムクロリド中の塩基組成依存性ハイブリダイゼーション:高度に複雑な遺伝子ライブラリーのオリゴヌクレオチドスクリーニング方法;Woodら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1585-1588(1985))。

【0049】標的配列のためのプローブは18S rRNA遺伝子配列又はそれらの相補体由来することができる。G. ランプリアの18GリボゾームRNA遺伝子

の配列は2つのグループにより公表されている[So gin, M. L. ら、Science 243, 75-77(1989); Healeyら、Nucleic Acids Res, 18, 4006(1990)]。プローブは塩基A, G, CもしくはT又は類似体(イノシン及び5-メチルシトシンを含む)から成ることができる。プローブは標的領域に広がる任意の長さであることができるが、プライマーを含まず、標的領域への特異的ハイブリダイゼーションを可能にするものである。

10 【0050】一般に、プローブは少なくとも14ヌクレオチドを有し、好ましくは少なくとも16ヌクレオチドを有するであろう。標的配列は相補的DNA鎖のいずれから来てもよい。完全な相補性が存在する場合、すなわち、株がプローブの配列と同じ配列を含む場合、ストリンジエント条件下においてさえデュプレックスは比較的安定であり、そしてプローブは短かくてもよい、すなわち約10~20塩基対の範囲であることができる。プローブとのある程度のミスマッチが予想される場合、すなわち、プローブが変化領域とハイブリダイズすることが

20 予想される場合、プローブはより長くてもよい。なぜなら、ミスマッチの効果の幾らかを埋め合わせると考えられるからである。

【0051】プローブは標的領域のサブセットから形成することができ、そしてそれ故に全標的領域にわたる必要がない。標的領域の任意のサブセットが標的領域を特異的に同定する可能性を有する。さらに、それが検出されるべき種に十分に特異的である限り、プローブの断片を使用することもできる。所望により、プローブも標識され得る。適当な種々の標識、及びプローブ中にそれを含める方法が当業界において知られており、そして例えば放射性原子、例えば³²P、又は他の認識され得る官能基、例えばビオチン(好ましくは、スパーサーアームを使用する)、蛍光色素、電子密度試薬、容易に検出可能な反応生成物を生成することができる酵素(例えば、アルカリ性ホスファターゼ、及び西洋ワサビペーオキシダーゼ)、又はそれに対して特異的な抗血清又はモノクローナル抗体が得られる抗原が包含される。

30 【0052】本明細書において記載されるPCRアッセイのために使用すべきプローブを得るために、標的領域の十分なヌクレオチド配列が知られていなければならない。標的領域のヌクレオチド配列の分析は、Gyllensten及びErlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652(1988)並びに米国特許No. 5, 066, 584に記載されているようにPCR増幅生成物の直接分析であることができ、あるいは単離されたPCR増幅DNA断片のプラスミドベクターへのクローニング、及び挿入部含有ベクターDNAにより形質転換された細菌から得られたDNAの配列決定によることができる。

50 【0053】プローブにより検出されるPCR生成物の

長さを決定することが望ましい。変異株が標的領域内に欠失又は挿入を含むことが予想される場合、あるいはPCR生成物の長さを確認することを望む場合、上記のことは特に真実である。このような場合、生成物をサイズ分析及びプローブとのハイブリダイゼーションにかけることが望ましい。核酸のサイズを決定する方法は当業者において知られており、例えばゲル電気泳動、向勾沈降、及びゲル排除クロマトグラフィーを含む。

【0054】本発明においては、18S rRNA遺伝子の部分の試験管内増幅に従い原生動物ギアルジア・ランブリア (G. ドゥオデナリス) を検出するためにPCRが使用される。この系は高い分析感度を有し、精製された核酸を用いての検出限界に1生物体相当のDNAより少ないオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションは、測定法がヒトの寄生虫G. ランブリアに特異的であることを可能にする。多くの地域から得られた30を超える異なる単離体がこの測定法により検出されている。

【0055】18S配列は今までギアルジアの診断のために使用されていないのみならず、この生物に対してPCRを使用した報告も存在しない。G. ランブリアは進化の真核系列において最も早い分岐系統を代表し、従ってそのリボソームDNA配列は真核生物及び原核生物からPCRの使用により容易に識別され得る。予想外にも、このPCR系はギアルジアの3つの比較的異なる種を増幅した。特定のハイブリダイゼーションプローブの使用が、この系を、ヒトに対して病原性のギアルジアの種であるG. ランブリアに特異的なものになっている。予想外にも、G. ランブリア単離体間で増幅された領域について3種類の異なる配列が見出された(第I表を参照のこと)。この可変性が種群特異的プローブの配列の基礎を与えた。さらに、標的配列の効果的な増幅が反応中の補助溶剤の存在を必要とした。

【0056】前記のギアルジアPCR測定を増幅効率及び全体感度が、変性温度、アニーリング温度及びマグネシウム濃度の最適化、並びに最も重要なことに2種類の異なる補助溶剤グリセロール及びジメチルスルホキシドを含めることにより、数オーダー上昇した。PCRにおける補助溶剤の使用は、プライマーのアニーリングのために利用可能な鋳型の量に影響を与える鋳型の変性(最初のゲノムの変性及びそれに続くアンプリマンの変性の両方)の増加によるG/C富配列の増幅を増強すると信じられる。これはまた、Taqポリメラーゼによるプライマーの伸長に影響を与え、そして二次構造によるプライマー伸長を促進する。

【0057】C/G-富ギアルジア標的配列の増幅のため、補助溶剤の主たる効果は、プライマー伸長における鋳型の変性の関与であると信じられる。プラスミドベクター内の挿入部からの20及び40bpに位置する領域に相補的であるプライマーを用いて、クローン化された

18SアンプリマンのDNA配列決定が行われる場合、クローン化された挿入DNAの増幅のために、「最適化された」条件が必須であった。さらに、dGTPの部分のための塩基類似体クエアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-トリホスフェートの置換は標的の増幅を促進しなかった。但し、この塩基は補助溶剤の存在下でTaqポリメラーゼにより導入され得ず、ゲノムDNAの変性を含む最初のサイクルが制限段階であることが示された。

【0058】後に記載する様に、標準的増幅条件は、本発明のプライマーにより挟まれた標的DNAの増幅をほとんど又は全くもたらさなかった。特定のDNA標的生成物の増幅を達成するために、PCR増幅混合物中に1又は複数の補助溶剤を含めることが必要であることが示された。1又は複数の補助溶剤は反応混合物中に約1~20%(V/V)の量(濃度)で添加されるであろう。適当な補助溶剤にはグリセロール、ジメチルスルホキシド及びホルムアミドが含まれ、前者が好ましい。特に好ましい態様においてグリセロール及びDMSOが一緒に使用される場合、これらは、グリセロールについては好ましくは5~20%(V/V)、さらに好ましくは10~15%、最も好ましくは約10%の濃度で添加され、そしてDMSOについては約3~10%、最も好ましくは約5%で添加される。

【0059】さらに、PCR混合物中にこれらの補助溶剤を使用する場合、本発明において有用な条件の最適化が好ましいであろう。本発明において使用するためのPCR反応の他の好ましい変更はマグネシウム濃度の0.75~1.25mM、好ましくは1.0mMへの低下である。

【0060】生物学的サンプル中の標的配列の存在は、PCR増幅技法にかけられた核酸とプローブとの間にハイブリッドが形成されているか否かを決定することにより検出される。プローブと核酸配列との間に形成されたハイブリッドを検出する方法は当業界において知られている。例えば、標識されていないサンプルが固体マトリクスに移され、それに結合し、そして結合したサンプルは、標識されたプローブとの特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件にかけられる。次に、固体マトリクスは、標識されたプローブの存在について試験される。

【0061】あるいは、サンプルが標識される場合、未標識のプローブがマトリクスに結合され、そして適当なハイブリダイゼーション条件への暴露の後、マトリクスが標識の存在について試験される。Saikiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230-6234(1986)は、固体支持体上に複数のプローブを固定化し、そしてハイブリダイゼーションを用いて注目の増幅された標的ポリヌクレオチド検出する方法を記載している。

【0062】この方法は、1つの臨床サンプル中の複数

の病原体の同時同定を提供することができるプローブのパネルの使用によく適合する。他の方法においては、標識されたポリヌクレオチドプローブと共に液相サンドイッチ測定法が使用され、そしてこの様なプローブの調製方法に米国特許No. 4, 820, 630に記載されている。

【0063】ここに記載されるプローブは、それらを用いてサンプル中にいかなる病原体が存在するかを検出及び同定することにより、ランブル鞭毛虫症の検出のために好適に適用される。後に記載するプローブ及び追加のプローブは、Saikiら（前掲）により記載された逆ドットプロット方式において配置することができる。プローブの各々を別々のドットとして固体支持体、例えばナイロン膜又はマイクロタイタープレート上に固定化する。増幅されたDNAを水溶液中で同時にプローブの各々にハイブリダイズさせる。ドット（すなわちプローブ）の各々からのシグナルのパターンが標的DNAの同一性を示す。

【0064】さらに、前記のPCR法のいずれかを実施するためのPCRキットも本発明の範囲内である。診断キットは別々の容器にポンプヌクレオチドプローブ及びプライマーを含む。これらのいずれかが標識されていてもよく又は標識されていなくてもよい。標識されていない場合、標識化のための成分がキットに含まれていてもよい。キットはまたは、特定のハイブリダイゼーション法のために必要な、他の適当に包装された試薬及び材料、例えば標準及び／又は重合試薬、並びに試験を実施するための指示書を含んでいてもよい。

【0065】使用において、PCRキットの成分は、核酸サンプルに適用される場合、標的核酸配列の検出及び増幅を可能にする試薬混合物を作る。従ってこの試薬混合物はキットの成分、及び注目のポリヌクレオチド鎖を含有する核酸サンプルを含む。

【0066】この方法の変法は、増幅された標的領域を生成する他の方法を使用することである。例えば、TAS増幅系〔Kowohら、転写に基づく増幅系、及びビーズを基礎にするサンドイッチハイブリダイゼーション方式を用いる増幅されたヒト免疫不全ウイルスタイプIの検出、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177 (1989)（及びその変法、SSSR〔Guatelliら、レトロウイルスの幅製をモデルとする多酸素反応による核酸の試験管内増幅、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990)〕は、鋳型のcDNAコピーを生成するcDNA段階及び該cDNAのコピー数を増加させるRNA転写段階から成るサイクルを用いてRNA又はDNAを増幅する方法である。

【0067】この方法はPCRと同様に、標的領域の相対する鎖にハイブリダイズしそして標的領域を挟む2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。本明細書に

記載されるプライマーは、わずかな変更（プライマーの一方の5'-末端へのRNAポリメラーゼプロモーターの付加）を伴って、TSA又はSSSR増幅系において使用することができる。測定のその次の段階、本明細書に記載するオリゴヌクレオチドプローブによる検出は、PCRに基づく測定法について前記したのと実質的に同様にして、又はビーズに基礎を置くサンドイッチハイブリダイゼーション系を用いて行うことができる。

【0068】更なる特定のため、下記のプローブ及びプライマーヌクレオチド配列データが提供される。プライマーJW1（配列番号；4）はSoginの文献に特定されているG. ランブリア18SリボソームRNA遺伝子のヌクレオチド塩基番号1251-1270に相当する。プライマーJW2（配列番号；5）はSoginの文献に特定されている。G. ランブリア18SリボソームRNA遺伝子中のヌクレオチド塩基番号1433-1414の相補体に相当する。

【0069】RDR34（配列番号；6）、RDR317（配列番号；7）及びRDR35（配列番号；8）は種々のギアルジアの種についてのオリゴヌクレオチドプローブである。RDR34（配列番号；6）及びRDR317（配列番号；7）は18S rRNA遺伝子のヌクレオチド塩基番号1306-1291の相補体に相当し、RDR35（配列番号；8）は18S rRNA遺伝子のヌクレオチド塩基番号1363-1378に相当する。

【0070】RDR34（配列番号；6）は一次プローブである。RDR317（配列番号；7）はG. アルデリア（*G. ardeae*）及びG. ランブリアのサブセットとハイブリダイズする。RDR35（配列番号；8）はG. ランブリアに特異的であるが、しかし感度は低い。第I表は後記のごとくとして単離されたヌクレオチド配列を記載しており、これを用いて断片もしくはそのサブ配列又はそれらの相補体に対応する種特異的のプローブ及びプライマーを設計又は調製することができる。

【0071】

【実施例】次に、実施例により本発明の種々の方法及び化合物を説明する。

例1. PCR用DNAを得るため及び配列データを得るために使用される材料及び方法

【0072】A. DNA源

DNAは第II表に示すギアルジア単離体からのものを用いた。DNAの抽出のため単離体の無菌培養を用いた。第II表に挙げるG. ランブリア単離体3〜20からのDNAはNational Institutes of Health, Bethesda, MD, 米国のT. Nash博士から入手し、第II表に挙げるG. ランブリア単離体、ギアルジア・ムリス（*Giardia muris*）、ギアルジア・アルデア、及びトリトリコモナス・フェタス（*Tritrichomonas fetus*）

us) からのDNAはCleveland State University, Cleveland, OH, 米国のH. van Keulen博士から入手した。

【0073】ATCC30888株 (Portland-1株) 及び30957 (WB株) (第II表に示す単離体1及び2) はATCCから直接入手して培養した。DNAはこれらの2つの培養物からペレット化した細胞から、Sambrook, J. のMolecular Cloning: a Laboratory Manual, p. 9. 16-9. 19 (1989), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 米国、に記載されている方法に従って、ドデシル硫酸ナトリウム及びプロテイナーゼKを用いて抽出した。

【0074】ライシュマニア・マジョール (*Leishmania major*) 513株及びエンタモエバ・ヒストリチカ (*Entamoeba histolytica* HM-1) のDNAを、University of California at San Francisco, 米国のJ. Sakanari博士から入手し、トリパノソマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*) 117及びトキソプラズマ・ゴンディー (*Toxoplasma gondii*) のDNAはStanford University, Stanford, CA, 米国のJ. Bang博士から入手し、そして大腸菌DNA及びヒト胎盤DNAのプールはSigma社 (St. Louis, MO, 米国) から得た。

【0075】B. DNAのクローニング

G. ランプリア (Portland-1株) の18S rRNA遺伝子の1.02KB挿入部を含有する陽性対照プラスミドPJW101を次の様にして作製した。例1Aから得られたギアルジアDNAを、ヌクレオチド432-1453からPCRにより、whiteら (1990) Innisら編、PCR方法、Academic press, San Diego, CA, 米国により同定されているプライマーNS3及びNS8並びに例2に記載する方法を用いて増幅した。増幅されたDNAをDNAポリメラーゼ1 (Klenow断片) により処理した。次に、適切なサイズの断片をゲル精製し、そしてHincIIで消化したプラスミドpUC19のDNAに平滑末端連結し、そしてコンピテントDh5αF' 細胞を形質転換するために用いた。

【0076】18S rRNA遺伝子のヌクレオチド1251-1433に対応するDNAを、PCRにより、プライマーJW1 (配列番号: 4) 及びJW2 (配列番号: 5) 並びに例2に記載する方法を用いて、10種類の異なるG. ランプリア単離体 (第II表及び例1を参照のこと) のDNAから増幅した。前記のようにしてDNA断片を単離しそしてpUC19ベクターDNAにクローニングした。

【0077】C. DNAの配列決定

挿入部を含有するクローンからのプラスミドDNAを精製しそしてC' dGTP及びUSB SequenaseTMバージョン2.5キットを用いて2本鎖配列決定した。各連結反応からの幾つかのクローンを配列決定した。DNA配列決定の結果については第I表を参照のこと。G. ランプリア単離体は18S rRNA遺伝子のこの領域のDNA配列に基いて3群 (配列番号: 1、配列番号: 2、及び配列番号: 3) に分けることができた。

10 【0078】D. ホルマリン固定した糞便検体からのDNAの抽出

胃腸寄生虫感染を有することが疑われる患者から24個のホルマリン固定糞便検体を得た。検体は寄生虫について顕微鏡分析されていた。検体の幾つかはG. ランプリアに加えて、又はそれ以外の寄生体、例エンタモエバ (*Entamoeba*) E. コリ (*E. coli*)、E. ハルトマンニ (*E. hartmanni*)、E. ヒストリチカ (*E. histolytica*)、アスカリス (*Ascaris*)、タエニア (*Taenia*)、トリクリス (*Trichuris*)、エンドクリマキシナ (*Endoclimaxnana*)、プラストシスチス・ホミニス (*Blastocystis hominis*)、イオダモエバ・ブチリ (*Iodamoeba butchilii*)、ヒメノレプシス・ナナ (*Hymenolepsis nana*)、シエンタモエバ・フラギリス (*Dientamoeba fragilis*)、及びチロマスチクス・メスニリ (*Chilomastix mesnili*) を含有していた。

【0079】検体の半分はG. ランプリアについて検鏡的に陰性であった。サンプル間の汚染を防止するために陽性排出ピペットを用いて次の様にして糞便検体から全DNAを抽出した。10%の緩衝化ホルマリン中糞便検体200μlを1.5mlのマイクロ遠心管に移し、そして15,000xgにて5分間遠心した。上清を除去して約50μlのペレットを残した。このペレットを50mM Tris-HCl (pH8)、10mM EDTA、150mM NaClに再懸濁し、そしてドライアイス-エタノール浴中での凍結及び37℃での解凍のサイクルにかけた。次に、溶液にドデシル硫酸ナトリウム及びプロテイナーゼKを加えてそれぞれ0.5%及び100μg/mlの濃度とし、そして次に55℃にて30分間インキュベートした。

【0080】次に、検体をさらに2回の凍結及び解凍のサイクルにかけ、次に、95℃にて10分間加熱した。この混合物を750xgにて遠心して残渣を除去し、そして上清液をとり出しそして保持した。上清をRHaase (200μg/ml) により37℃にて30分間消化した。次に、サンプル中のDNAをフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) により界面がきれいになるまで、(3~5回) 精製し、そして

次にエタノールで沈澱させた。DNAを0.1mlの10 mM Tris-HCl、0.1 mM EDTA (pH 8.0) に再懸濁した。抽出物の1:100希釈物はPCR反応に加えるためのDNAの最適希釈であった。

【0081】例2. ギアルジアDNAのPCR増幅

C. ランプリア rRNA遺伝子の183 bp領域を増幅するためにプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドの配列は、JW1上流プライマー5' GCGCAC CAGGAATGTCTTGT3' (ヌクレオチド1251-1270) (配列番号: 4) 及びJW2下流プライマー5' TCACCTACGGATACCTTGT3' (ヌクレオチド1433-1414) (配列番号: 5) であり、常用のオリゴヌクレオチド合成により作製された。増幅は、例1におけるサンプルから得られた50 µlのDNA、及び他の反応成分を含む、2×混合物50 µlを含有する100 µlの反応混合物中で行われた。

【0082】2×反応混合物は20 mM Tris-HCl (pH8.3)、100 mM KCl、2 mM MgCl₂、200 µg/mlゼラチン、20% (W/V) グリセロール、10%ジメチルスルホキシド、125 µMの最終濃度のdATP、dGTP、dCTP及びdTTP、2.50のTaq DNAポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn. 米国) 及び25 pmoleの各プライマーを含有していた。

【0083】反応混合物を95℃に5分間加熱し、次に25サイクルの[95℃、40秒間; 50℃、30秒間; 及び72℃、2分間]、10サイクルの[98℃、45秒間; 50℃、30秒間; 及び72℃10分間]並びに72℃にて10分間の最終伸長をDNA熱サイクラー中で行った。得られる増幅反応生成物を第II表のすべての単離体1~36について例3の方法により分析した。

【0084】糞便サンプルから抽出されたDNAについて、前記と同じ方法を用いたが、95℃にて1分間、50℃にて1分間及び72℃にて1分間から成る50サイクルを用いた。糞便サンプルからの増幅されたDNA配列を例3の方法により分析した。PCR反応は、反応生成物が分析される場所とは別の室においてフード内で行った。ポジティブ性排出ピペット、各実験における負対照、及び汚染を防止するための他の措置がS. Kwock及びR. Higuchi, Nature 339, 237-238 (1989) の示唆に従って観察された。

【0085】例3. 増幅された生成物の検出及び分析

例2の増幅反応のアリコート(10 µl)を電気泳動により、3%NuSieveアガロース/0.5%SeaKemアガロースゲル中で分析し、そしてDNAを臭化エチジウム染色及び長波長UV光による照射によって可視化した。特異的増幅生成物のサイズは183 bpであ

った。次に、放射性標識された特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いるサザンハイブリダイゼーション又はドットプロット分析を次の様にして行った。

【0086】サザンハイブリダイゼーションのため、臭化エチジウム染色されたアガロースゲルを0.5 N NaOH/1.5 M NaCl中で15分間変性し、次に1 M Tris-HCl (pH7.5)/1.5 M NaCl中で15分間中和した。DNAを毛细管トランスファーにより一夜、10×SSPE緩衝液(1×SSPEは0.18 M NaCl、10 mMリン酸ナトリウム、1 mM EDTA、pH7.4)を用いてあらかじめ湿らせたナイロン膜(Genatran 45) (Plasco, Woburn, MA米国)に移した。

【0087】ドットプロット分析のためには、10 µlのPCR反応溶液を100 µlの0.4 N NaOH/25 mM EDTA中で室温にて5分間変性した。100 µlをナイロン膜に、ドットプロット装置(Bio-Rad, Richmond, CA米国)及び真空の適用を用いてスポットした。紫外線に暴露することによりDNAを膜に架橋した。

【0088】オリゴヌクレオチドプローブを[γ-³²P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA米国; 比活性6000 Ci/mmole) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端標識し、そして次に2本の引き続くBioGel p-4 (BioRad, Richmond, CA, 米国) スピニングカラムを通すことにより末結合のATPから精製した。プローブに導入された放射能のレベルを、シンチレーション液を用いないで、3 µlのプローブ溶液からシンチレーションカウンター中でCerenkov放射を測定することにより推定した。

【0089】第I表の配列を説明することにより得られたプローブの配列は、RDR34: 5' AGGGACGCGTCCGGCG3' (ヌクレオチド1291-1306の相補体) (配列番号: 6)、RDR317: 5' AGGGACGCGATCCGGCG3' (ヌクレオチド1291-1306の相補体) (配列番号: 7)、及びRDR35: 5' CGGACGCGCGAAGGGC3' (ヌクレオチド1362-1377) (配列番号: 8)である。

【0090】フィルターを、5×SSPE、0.5% SDS、0.5%デキストランサルフェートを含有する溶液中で60℃にて30分間プレハイブリダイズさせた。このハイブリダイゼーション溶液に一定容量の³²P標識化プローブを2×10⁵ cpm/mlの最終濃度に添加し、そして60℃にて3時間インキュベートした。プローブとのインキュベーションに続き、フィルターを37℃にて2回5×SSPE/0.1% SDS中でそれぞれ1分間及び10分間洗浄した。

【0091】次に、3 M TMACl溶液(3 Mテトラ

メチルアンモニウムクロリド、50mM Tris-HCl、pH8.0、0.1% SDS、2mM EDTA) 中で51℃にて10分間ストリンジエント洗浄を行った。35℃の洗浄濃度を変えることにより上昇したストリンジエンシーが得られた。TMACIはA-T及びG-C塩基対の相対結合性を等しくし、ハイブリダイゼーションの効率がプローブの長さの関数となる。

【0092】こうして、ストリンジエンシーのレベルは、TMACI洗浄溶液の温度を変えることにより制御される。フィルターを乾燥し、そして強化スクリーンを用いて3~18時間-70℃にてX-Omat XAR-5フィルムに暴露した。インプットされたギアルジアDNAにより得られたシグナルの強度を、インプット鋳型DNAのない負対照反応のそれと比較した。

【0093】例4. 増幅に対する補助溶剤の効果

G. ランブリアの18S rRNAの遺伝子の公表された配列[Soginら、Science 243, 75-77 (1989); Healeyら、Nucl. Acids. Res. 18:4006 (1990) (配列番号: 1)、並びに原核性及び真核性小サブユニットrRNA遺伝子の整列(Neeffsら、Nucl. Acids. Res. 18, 2237-2317 (1990))]を用いて、18S rRNA遺伝子配列の183bp領域を増幅するために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。原生動物種の中程度に保存された領域を残しながら、原核性DNA及びヒトDNAの増幅を特異的に回避するためにプライマーを注意深く選択した。

【0094】G. ランブリアDNA (Portland-1株、例1に記載)、25pmoleずつのプライマーJW1 (配列番号: 4) 及びJW2 (配列番号: 5)、標準増幅緩衝液(10mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン)、及び95℃にて5分間の変性段階につづく、95℃にて40秒間、50℃にて30秒間及び70℃にて2分間の30サイクルを用いる最初のPCR実験、並びにそれに続く72℃にて10分間の最終伸長時間により、アガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色によって検出される増幅は得られなかった。

【0095】プライマーJM1 (配列番号: 4) と JW2 (配列番号: 5) により挟まれた標的DNAはG/Cリッチ(72%)であり、そして多くの安定なヘアピンループ構造を有するので、ヘリックス不安定化塩基類似体リーデアザー2'-デオキシグアノシン-5'-トリホスフェート(c'dGTP)を、c'dGTP:dGTPの3:1混合物としてPCR反応に含めた。

【0096】Taq DNAポリメラーゼは通常速度をもってc'dGTPを導入し [Innisら、Proc. Natl. Acad. Sci. 米国, 85:9436-9440 (1988)] そしてc'dGTPの使用

が高度に構造化された配列の増幅を促進することが観察された [McConlogueら、Nucl. Acids. Res. 16:9869 (1988)]。

【0097】従って、dGTPの75%をc'dGTPで置き換えるという変更を加えて、増幅反応は前記のようにして行われた。200pg、2ng、及び20ngのG. ランブリアPortland-1株DNAを30サイクルのPCRの2連の反応において増幅した。増幅後、生成物をアガロースゲル電気泳動により検出した。10 目的とする標的配列の増幅は得られなかった。しかしながら、上記の増幅反応にグリセロールを加えたとき、10%の最後濃度において、G. ランブリア183bp生成物の特異的増幅が生じた。

【0098】10%のグリセロールが最適の結果をもたらした(0~15%が試験された)。PCR反応生成物に5%のジメチルスルホキシドを加えることにより、特異的増幅生成物の収量がさらに増加した。グリセロールを含めることにより、PCR中にc'dGTPが導入されたが、収量に影響を与えなかった。18S rRNA 20 遺伝子からの特異的増幅生成物を第I表に示す。

【0099】例5. 増幅及びプローブハイブリダイゼーションの感度

2種類の補助溶剤(グリセロール及びDMSO)の添加、最初の10サイクルのサイクルプロフィールにおける変性温度の上昇(98℃)、及びマグネシウム濃度の1.0mMへの低下を含む、反応条件の最適化の後、PCR増幅及びプローブ検出の検出限界を測定した。

【0100】ゲノムG. ランブリアPortland-1株DNA及び例1のプラスミドDNA (G. ランブリア18S rRNA遺伝子の1.02KBセグメントを含有するPJW101)の希釈物を10⁶個の大腸菌細胞からのDNA(2ngのDNA)の存在下で、例2に記載した。プライマーJW1及びJW2を用いての増幅の35サイクル及び45サイクルにかけた。サイクル数の増加と共にインプットG. ランブリアDNAから得られた増幅生成物の収量が増加し、これはアガロースゲル電気泳動及び臭化エチジウム染色により観察された。さらに多くのサイクルにより、さらに少ない量のインプット鋳型DNAが電気泳動後の観察可能なバンドをもたらした。30

【0101】増幅されたDNAが、変性及びナイロン膜への適用に続き、例3に記載の³²P-標識オリゴヌクレオチドプローブRDR34とハイブリダイズされた時、検出限界は、ゲル電気泳動に続き10~100倍に増加した。インプット鋳型DNAの負対照反応のバックグラウンドシグナルに対する18時間フィルム暴露からのシグナル強度が検出限界を構成した。増幅及びハイブリダイゼーション後の検出限界は約10~100コピーの標的DNAであり、これはゲノムDNAの栄養型(trophozoite) 50 含量≦と同等である。栄養型は約6

3コピーの18S rRNA遺伝子を含有する。

【0102】例6. 増幅及びプローブハイブリダイゼーションの特異性

5種類の原性動物寄生虫〔エンタモエバ、ヒストリチカ (*Entamoeba histolytica*)、ライシュマニア・マジョール (*Leishmania major*)、トリパノソマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*)、トキソプラズマ・コンディエー (*Toxoplasma gondii*) 及びトリトリコモナス・フェタス (*Tritrichomonas fetus*) から得られた2 ngのDNA、2 ngの大腸菌DNA、25 ngのヒト胎盤DNA、正常(対照)糞便検体から抽出されたDNA、並びに、例5に記載したG. ランブリアPortland-1 DNA 200 fg~2 ngを用いてPCR増幅の特異性を評価した。

【0103】例1に記載したようにして得られたDNAのすべてのサンプルを、例2に記載した方法に従って、プライマーJW1(配列番号:4)及びJW2(配列番号:5)を用いるPCRによる増幅にかけた。増幅反応物を例3に記載したようにしてゲル電気泳動により分析した場合、ヒト、大腸菌又は糞便サンプルから抽出されたDNAの増幅は観察されなかった。E. ヒストリチカ、L. マジョール、及びT. フェタスから増幅生成物を得られたが、生成物のサイズはG. ランブリアのそれよりも長かった。G. ランブリアは、今日まで配列決定された中で最も小さい18S rRNA遺伝子を含有する。

【0104】次に、増幅されたDNAを、例3に記載した方法により、プローブRDR34(配列番号:6)を用いるザンハイブリダイゼーション分析にかけることによりプローブ結合の特異性を評価した。他のどのDNAへの結合も観察されず、プローブRDR34(配列番号:6)がギアルジア属に対して特異的であることが示された。

【0105】さらに、例1に記載したギアルジアの他の2種(G. ムリス及びG. アルデア)から単離されたDNAも前記の方法により分析された。ゲル電気泳動により観察した場合、プライマーJW1(配列番号:4)及びJW2(配列番号:5)はG. ムリス(ハムスターから得たもの)及びG. アルデア(大青サギから得られたもの)の両者からの特異的生成物を増幅し、そして約185~200 bpのサイズの単一生成物を生成した。前記のプローブRDR34(配列番号:6)を用いてのサ

* ザンハイブリダイゼーション分析は、このプローブが、前記2種のギアルジアからの増幅生成物にハイブリダイズしないことを示した。すなわち、RDR34(配列番号:6)はヒト宿主に感染するギアルジアの種、がギアルジア・ランブリアとのみハイブリダイズである。

【0106】例7. 他のG. ランブリア単離体の増幅及び検出

いずれも例1に記載されているG. ランブリア(G. ドウオデナリス)のさらに32の単離体(Portland-1株及びWB株に加えて)を同様に、例2及び3に記載する方法を用いて、PCR及びRDR34(配列番号:6)とのハイブリダイゼーションにより評価した。すべてのG. ランブリアDNAがゲル電気泳動により同定される特異的増幅生成物をもたらした。

【0107】オリゴヌクレオチドプローブRDR34

(配列番号:6)は種々のG. ランブリア単離体の増幅された生成物のすべてに特異的にハイブリダイズした。予想外にも、ザンハイブリダイゼーション分析において非常にストリンジエントな条件が用いられた後(53℃TMACT洗浄温度)、G. ランブリアの3種類の異なるサブセットが、結合したプローブRDR34(配列番号:6)から残るシグナル強度に基いて示された。結果を第II表に示す。

【0108】次に、G. ランブリアの3群のヌクレオチド配列の相違が示された。各サブグループ(第II表中星印により示される)構成員を含む10個の異なる単離体からの増幅された断片のDNA配列を、例1に記載した方法に従ってPUC19 DNAにクローリングした後に得た。DNA配列決定の結果が第I表に示され、そしてグループ1(配列番号:1)グループ2(配列番号:2)及びグループ3(配列番号:3)に分類される。第I表に見られるように、各グループのDNAは他のグループに比べて1つの塩基対変化を含んでいた。

【0109】プローブRDR34(配列番号:6)の代替物として、プローブRDR317(配列番号:7)を、グループ3のDNAに優先的にハイブリダイズするように設計した。前記の増幅されたDNAのすべてを、前記の方法に従う非常にストリンジエントな条件下でプローブRDR317(配列番号:7)とのハイブリダイゼーションにかけた場合、このプローブは予想通り、グループ3の単離体からのDNA(配列番号:3)にのみハイブリダイズした。結果を第II表に示す。

【0110】

【表2】

10

20

30

40

*

第II表

単離体	地理的位置	宿 主	ブローブ RDR34	RDR317 との ハイブリダイゼーション
1. Portland-1 (ATCC30888)	米国	ヒト	+	-
2. WB (ATCC30957)	アフガニスタン	ヒト	+	-
3. Be-1 (IP-0482:1) *	カナダ	ビーバード	+	-
4. Be-2 (IP-0583:1)	カナダ	ビーバード	+	-
5. E-4/M (NIH0285:4)	エジプト	ヒト	+	-
6. E-2/M (NIH0285:2) *	エジプト	ヒト	+	+
7. E-9/M (NIH0285:9) *	エジプト	ヒト	+	-
8. G1M *	ペルー	ヒト	+	-
9. G2M	ペルー	ヒト	+	-
10. G3M	ペルー	ヒト	+	-
11. PM (NIH0988) *	米国	ヒト	+	-
12. WB (NIH1179) *	アフガニスタン	ヒト	+	-
13. Ist (NIH1183)	アフガニスタン	ヒト	+	-
14. CAT-1	米国	ヒト	+	-
15. GP	米国	ネコ	+	-
16. CM (NIH0883:2) *	米国	モルモット	+	-
17. JH (NIH1182) *	米国	ヒト	+	+
18. N (NIH0782)	米国	ヒト	+	+
19. AB (NIH0883:1) *	ペルー	ヒト	+	+

【表3】

第II表 (続き)

単離体	地理的位置	宿主	プローブ RDR34	RDR317との ハイブリダイゼーション
20. GS/M-H7 (NIH1083:2)*	米国	ヒト	+	-
21. Portland-1 CCW	米国	ヒト	+	-
22. Portland-1	米国	ヒト	+	-
23. BG	カナダ	ビーバ	+	-
24. H-1-P	米国	ヒト	+	-
25. H-2-P	米国	ヒト	+	-
26. WB	アフガニスタン	ヒト	+	-
27. B5	カナダ	ビーバ	+	-
28. MR4	カナダ	マスクラット ^b	+	-
29. D3	カナダ	イヌ	+	-
30. P1/C	カナダ	ヒト	+	-
31. CAM	カンボジャ	ヒト	+	-
32. S1	カンボジャ	ヒト	+	-
33. LCP/New Orleans-1 ^c	米国	ヒト	+	+
34. CDC	米国	ヒト	+	-
35. B5	カナダ	ビーバ	+	-
36. CH3	カナダ	ヒト	+	-
37. G. muris	米国	ハムスター	-	-
38. G. ardeae	米国	アオサギ	-	+

【0112】第II表中の記号は次の意味を有する。

*) は増幅されたDNA断片の精製及び配列分析のために使用された単離体 (第I表参照のこと)。

a) 幾つかの単離体名がこの表中で複数挙げられているが、これらの株は別々の研究室で増殖させられたものであり、そして広範囲なインビトロ培養の間に異なる性質を獲得しているであろう。単離体の由来についての詳細な情報は公表されている。単離体No. 2~20、Nash, T. Eら、Mol. Biochem. Parasitol. 42, 125~132 (1990); 単離体No. 21~36、Van Keulen, H. ら、Mol. Biochem. Parasitol. 46, 275~284 (1991); 単離体No. 38, Erlandsen, S. L. ら、J. Parasitol. 76, 717-724 (1990)。

* 【0113】b) 仮定的、ヒトであるかも知れない。

c) ATCC50137とATCC50184の混合物の可能性あり。

+¹) 非常にストリンジントな洗浄条件下で、ハイブリダイゼーションがわずかに低下。

+²) 非常にストリンジントな洗浄条件下でハイブリダイゼーションが顕著に低下。

-) ストリンジントな条件下でプローブの結合なし。

【0114】例8. 糞便検体のPCR測定

胃腸寄生虫の感染を有すると予想される患者からのホルマリン固定した糞便検体を、プライマーにJW1 (配列番号: 4) 及びJW2 (配列番号: 5) を用いるPCRにより (例2及び3の方法に従って)、G. ランプリアDNAの存在について測定した。検体の半分は検鏡的にG. ランプリア陽性であり (栄養型及びシストの量は異

なる)、他の12検体は検鏡的にギアルジア陰性であったがしばしば他の寄生虫を含んでいた。

【0115】全DNAを糞便検体から、例1に記載の方法によるシストを溶解するための複数回の凍結-解凍サイクルと組合わせて、細菌細胞からDNAを抽出するための標準的技法【Silhavy, T. J.らExperiments with gene fusions, p137~139 (1984)、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 米国】を用いて、抽出した。単離されたDNAのアリコートにPCRにかけ、次にナイロン膜に移し、そして例2及び3に記載した方法に従って³²P-オリゴヌクレオチドプローブ(RDR34, RDR35, RDR317)とハイブリダイズさせた。

【0116】12個の検鏡的に陽性の検体の内8検体はPCR並びにプローブRDR34(配列番号:6)及びRDR35(配列番号:8)とのハイブリダイゼーションの後一貫して陽性であり、他方12個の検鏡的に陰性の検体の内10検体は一貫して陰性であった。他の4個の検鏡的に陽性の検体は一貫して陽性とは検出されず、そして2個の検鏡的に陰性の検体は前記の分析において陽性であった。

【0117】4個の検鏡的に陽性のサンプルについての一貫しない結果は、非常に低レベルのみのギアルジアを含有する糞便検体から独立の同一のサンプルを得ることが困難な結果であろう。2個の潜在的に偽陽性のサンプルはPCRの感度が顕微鏡診断技法に比べて高い結果であろう

陰性対照反応はすべての実験において常に陰性であり、上記のことが汚染にさる偽陽性ではないことが示され

配列:

GCGCACCAGG AATGTCTTGT AGGCGCCCGC CCCACCGCG CGCCGGACGC CTCCTGCCC 60
CTTGATACACA CCGCCCGTCG CTCCTACCGA CTGGGCGCGG CGGCGAGCGC CCCGGACGCG 120
CGAAGGGCCG CGAGCCCCCG CGCCTGGAGG AAGGAGAAGT CGTAACAAGG TATCCGTAGG 180
TGA 183

【0120】配列番号:2

配列の長さ:183

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列:

GCGCACCAGG AATGTCTTGT AGGCGCGCGC CCCACCGCG CGCCGGACGC GTCCTGCCC 60
CTTGATACACA CCGCCCGTCG CTCCTACCGA CTGGGCGCGG CGGCGAGCGC CCCGGACGCG 120
CGAAGGGCCG CGAGCCCCCG CGCCTGGAGG AAGGAGAAGT CGTAACAAGG TATCCGTAGG 180
TGA 183

【0121】配列番号:3

配列の長さ:183

鎖の型:核酸

配列の類:一本鎖

*た。

【0118】PCRのための鋳型DNAとしてG.ランブリアPortland-1株のDNAを用いて、プローブRDR35(配列番号:8)とのハイブリダイゼーションはRDR34(配列番号:6)に比べて弱いシグナルをもたらした。糞便サンプルからのDNAをPCR及びハイブリダイゼーションにより分析した場合、RDR35(配列番号:8)を用いて得られたシグナルはRDR34(配列番号:6)のそれに比べて常に低いわけ

10

20

30

【0119】

【配列表】配列番号:1

配列の長さ:183

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

アンチセンス:No

由来:

生物:ギアルジア・ランブリア(Giardia lamblia)

公表情報

著者:Sogin, M. L.

雑誌:Science

Vol:243

発行日:1989

*

※配列の種類:cDNA

アンチセンス:No

由来:

40 生物:ギアルジア・ランブリア

※

★トポロジー:直鎖状

配列の種類:cDNA

アンチセンス:No

★50 由来:

生物：ギアルジア・ランブリア

配列：

GCGCACCAGG AATGTCTTGT AGGCGCCCGC CCCACCGCG CGCCGGATGC GTCCCTGCCC 60
 CTTGTACACA CCGCCCGTCG CTCCTACCGA CTGGGCGCGG CGGCGAGCGC CCGGACGCG 120
 CGAAGGGCCG CGAGCCCCCG CGCCTGGAGG AAGGAGAAGT CGTAACAAGG TATCCGTAGG 180
 TGA 183

【0122】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：No

* 10

配列：

GCGCACCAGG AATGTCTTGT

20

【0123】配列番号：5

配列の長さ：20

鎖の型：核酸

配列の数：一本鎖

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：Yes

※

配列：

TCACCTACGC ATACCTTGTT

20

【0124】配列番号：6

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

★ トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：cDNA

アンチセンス：Yes

★

配列

AGGGACGCGT CCGGCG

16

【0125】配列番号：7

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：Yes

☆

配列：

AGGGACGCAT CCGGCG

16

【0126】配列番号：8

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

◆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

アンチセンス：No

◆

配列：

CGGACGCGG AAGGGC

16

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:90)